

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

AF

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



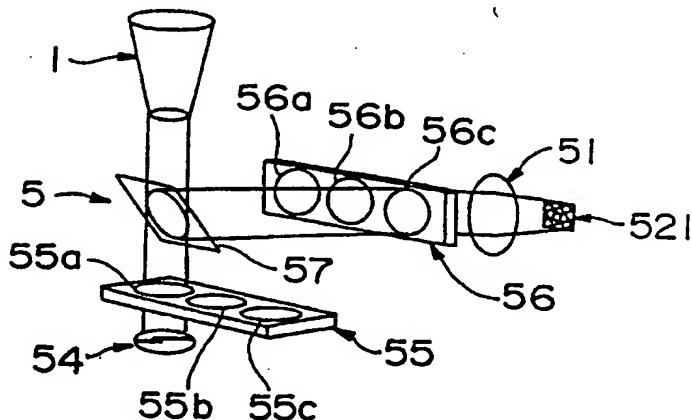
(51) 国際特許分類6 G01N 33/49	A1	(11) 国際公開番号 WO99/24831
		(43) 国際公開日 1999年5月20日 (20.05.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05043		
(22) 国際出願日 1998年11月10日 (10.11.98)		
(30) 優先権データ 特願平9/309069 特願平9/346842	1997年11月11日 (11.11.97) 1997年12月16日 (16.12.97)	JP JP
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP] 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号 Aichi, (JP)		(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 藤崎克己 (YABUSAKI, Katsumi) [JP/JP] 〒305-0045 茨城県つくば市梅園2-5-1 A-102 Ibaraki, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)		

(54) Title: METHOD OF COUNTING LEUKOCYTES AND LEUKOCYTE COUNTER

(54) 発明の名称 白血球数計測方法および白血球数計測装置

(57) Abstract

A leukocyte counting method which comprises adding a cytolytic agent to a platelet preparation solution or an erythrocyte preparation solution to solubilize the platelets or erythrocytes in the respective solution in a leukocyte container which comprises an opening section, a side section and a bottom section and wherein the whole or part of the side section is provided with a portion having a horizontal cross section progressively increasing in the direction from the bottom section toward the opening section, centrifuging the container to accumulate the leukocytes in the bottom section, and counting the leukocytes thus accumulated.



공개특허특2001-0031949

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 6
 G01N 33/49

(11) 공개번호 특2001-0031949
 (43) 공개일자 2001년04월16일

(21) 출원번호 10-2000-7005056
 (22) 출원일자 2000년05월10일
 번역문제출원일자 2000년05월10일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP 98/05043 (87) 국제공개번호 WO 99/24831
 (86) 국제출원출원일자 1998년11월10일 (87) 국제공개일자 1999년05월20일
 (81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 김비아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브وار, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 기네비쓰,

국내특허 : 알바니아, 오스트레일리아, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 대한민국, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 리투아니아, 라트비아, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 루마니아, 싱가포르, 시에라리온, 인도네시아, 그레나다, 유고슬라비아, 크로아티아,

(30) 우선권주장 97-3090691997년11월11일일본(JP)
 (71) 출원인 코와 가부시키가이샤 요시히로 미와
 일본국 아이치켄 나고야시 나카쿠 니시키 3쵸메 6-29
 (72) 발명자 야부사키가초미
 일본이바라켄 츠쿠바시 우메조노 2-5-1 에이-102
 (74) 대리인 이병호
 심사청구 : 없음

(54) 백혈구 계수 방법 및 장치

요약

개구, 측벽부와 저부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 백혈구 축적 용기내에서, 혈소판 제제의 용액 또는 적혈구 제제의 용액에 세포용해제가 첨가되어 제제의 용액내에 혈소판 또는 적혈구를 용해하고; 그 다음 백혈구 축적 용기는 원심분리기상에 세팅되어 백혈구 축적 용기의 저부상에 백혈구를 축적하며, 저부상에 축적된 백혈구가 계수된다.

대표도**도17****색인어**

백혈구, 적혈구, 혈소판, 백혈구 축적 용기, 세포용해제

명세서**기술분야**

본 발명은 백혈구 계수 방법 및 백혈구 계수 장치에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 혈소판 제제 또는 적혈구 제제에 있는 백혈구를 계수하는데 적절한 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

혈소판 제제 및 적혈구 제제는 혈소판감소증 및 빈혈의 완화, 외과 수술 등에 주로 사용된다. 효과측면을 고려하면, 백혈구가 혈소판 제제 또는 적혈구 제제에 존재하는 것은 질의 관점에서 바람직하지 않다. 따라서, 혈소판 제제 또는 적혈구 제제에 작은 양으로 함유될 수 있는 백혈구의 수를 질의 조절을 위해 측정한다.

통상, 혈소판 제제 또는 백혈구 제제의 백혈구 수는 백혈구의 핵을 노출시키고 착색함으로써 측정된다. 즉, 백혈구를 원심분리기 등으로 축적하고 착색한 다음 나게테(nageotte) 챔버(혈구계)에 배치시키므로 관측자는 현미경을 사용하여 그 숫자를 눈으로 계수한다. 혈소판은 이 방법으로 좀처럼 용해되지 않으므로 백혈구가 혈소판으로 가려지게 되어 측정률이 저하하게 된다. 또한, 시각 측정은 극히 비효율적이다. 더욱이, 이러한 측정 방법에서는 관측자가 생물학적 위험가능성(생물학적 오염)이 있는 혈액 제제와 자주 접촉하게 된다. 따라서, 측정 작업의 자동화 및 용이화를 달성할 뿐만 아니라 측정률의 개선을 달성하는 안전한 방법이 현재 요구되고 있다.

한편, 일반적으로 백혈구의 핵은 백혈구를 측정용으로 착색하기 위해 노출되어야 한다. 이 목적을 위해 계면활성제가 첨가되는 것은 공지되어 있다. 그러나, 백혈구를 계수하는 방법은 공지되어 있지 않으며, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판 또는 적혈구를 용해시키는 세포용해제는 혈소판 제제 또는 적혈구 제제에 있는 혈소판 또는 적혈구를 용해시키도록 사용된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 첨가된 트리톤(Triton) X-100의 각 농도에서 혈소판 제제내의 혈소판 수에 대한 측정 결과를 도시하는 도면.

도 2는 첨가된 트리톤 X-100의 각 농도에서 혈소판 제제 용액의 광투과도를 도시하는 도면.

도 3은 첨가된 트리톤 X-100의 각 농도에서 플로우 세포계산기에 의한 적혈구 제제의 적혈구 수에 대한 측정 결과와 노출된 백혈구핵 수에 대한 측정 결과를 도시하는 도면.

도 4는 본 발명의 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 전방 단면도.

도 5는 본 발명의 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 평면도.

도 6은 본 발명의 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 사시도.

도 7은 본 발명의 집합형 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 평면도.

도 8은 본 발명의 집합형 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 전방 단면도.

도 9는 본 발명의 집합형 백혈구 축적 용기의 일예를 도시하는 측단면도.

도 10은 본 발명의 백혈구 축적 용기의 다른 예를 도시하는 전방 단면도.

도 11은 본 발명의 백혈구 축적 용기의 다른 예를 도시하는 평면도.

도 12는 본 발명의 백혈구 축적 용기의 다른 예를 도시하는 사시도.

도 13은 축적전 포인트에서 축적후 포인트로 본 발명의 백혈구 축적 용기를 사용하여 혈소판 제제의 용액내에 있는 백혈구의 축적 공정을 도시하는, 백혈구 축적 용기의 전방 단면도로서, (i)는 축적전 상태를 도시하고, (ii)는 백혈구의 핵이 노출되어 착색되고 혈소판이 용해된 후의 상태를 도시하며, (iii)은 축적후의 상태를 도시한다.

도 14는 축적전 포인트에서 축적후 포인트로 저부에 박막 필터가 설치된 본 발명의 백혈구 축적 용기를 사용하여 혈소판 제제의 용액내에 백혈구를 축적하는 공정을 도시하는, 백혈구 축적 용기의 전방 단면도로서, (i)는 축적 전 상태를 도시하고, (ii)는 여과법에 의한 축적후의 상태를 도시하며, (iii)은 백혈구의 핵이 노출되어 착색된 후의 상태를 도시한다.

도 15는 본 발명의 백혈구 계수 장치의 일예의 원리를 도시하는 도면으로서, (i)은 전체 측정 장치를 도시하고, (ii)는 이미지 착상면상의 이미지를 도시한다.

도 16은 백혈구 계수 장치의 비교예의 원리를 도시하는 도면으로서, (i)은 전체 측정 장치를 도시하고, (ii)는 이미지 착상면상의 이미지를 도시한다.

도 17은 본 발명의 백혈구 계수 장치의 다른 예의 원리를 도시하는 도면.

발명의 상세한 설명

본 발명은 상기 환경의 입장에서 달성되었다. 본 발명의 목적은 혈소판 제제 또는 적혈구 제제에 있는 백혈구의 수를 용이하게 측정하는 방법 및 장치를 제공하는 것이다.

전술된 목적을 달성하기 위한 본 발명자들의 노력의 결과로서, 그들은 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판 또는 적혈구를 용해시킬 수 있는 세포융해제를 사용함으로써 백혈구 계수 측정이 용이해지고 시각 측정을 필요로 하지 않는 측정 장치가 달성될 수 있다는 것을 알았는데, 그 이유는 그러한 세포융해제가 혈소판 제제 용액 또는 적혈구 제제 용액에 첨가될 때 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판 또는 적혈구를 용해시킬 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명이 달성되었다.

즉, 본 발명은 백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 혈소판 제제의 용액에 용해시킬 수 있는 세포융해제를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 혈소판 제제의 용액에 용해시키는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법을 제공하는 것이다.

본 명세서에서는, 용어 "혈소판 제제"와 "혈소판 제제의 용액"이 사용된다. 이를 용어에 관해서는, 혈소판 제제가 처음부터 용액 형태라면, "혈소판 제제"는 "혈소판 제제의 용액"과 동의하다. 또한, 혈소판 제제가 고체 등의 형태이면 제제는 용해후에 용액으로서 사용될 수 있는 것으로 예상된다.

또한, 본 발명은 백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서, 개구, 축벽부와 저부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 영역을 갖는 축벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 축적 용기내에서, 혈소판 제제의 용액과, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 세포융해제와, 염료를 혼합 및 교반함으로써 혈소판을 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색하는 단계와, 원심분리기상에 상기 축적 용기를 세팅하여 상기 축적 용기의 저부상에 착색된 백혈구를 축적하는 단계와, 착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법을 제공한다.

백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색하는 것에 의한 측정에 있어서, 실제로 측정되는 것은 대개 노출 착색된 개별 백혈구 핵의 DNA 집합체이다. 본 명세서에서, 용어 "백혈구"는 보통 상태의 백혈구뿐만 아니라 노출 착색된 백혈구 핵의 DNA 집합체에도 적용된다.

상기 혈소판 제제내에 백혈구 계수 방법에서는, 혈소판 제제의 용액에 첨가된 세포융해제가 음이온 계면활성제,

양이온 계면활성제, 양쪽성 계면활성제, 및 비이온 계면활성제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것이 바람직하다. 혈소판 제제 용액에 첨가된 세포융해제의 양은 0.2 내지 5%(w/v)가 바람직하다.

또한, 본 발명은 백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서, 개구와, 측벽부와, 백혈구가 통과할 수 없는 박막 필터를 갖는 저부와, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 측적 용기내에 혈소판 제제의 용액을 배치하는 단계와, 혈소판 제제의 용액을 수용하는 측적 용기의 저부에 설치된 박막 필터를 통해 혈소판 제제의 용액을 여과하여 저부상에 백혈구를 축적하는 단계와, 상기 저부상에 축적된 백혈구에 계면활성제와 염료를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 백혈구를 착색하는 단계와, 상기 착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 백혈구를 착색함으로써 적혈구 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서, 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 적혈구 제제의 용액에 용해시킬 수 있는 세포융해제를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 적혈구 제제의 용액에 용해시키는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법을 제공한다.

본 명세서에서 용어 “적혈구 제제”와 “적혈구 제제의 용액”이 사용된다. 이들 용어로 말하면, 적혈구 제제가 처음부터 용액의 형태이면, “적혈구 제제”는 “적혈구 제제의 용액”과 동의하다. 또한, 적혈구 제제가 고체의 형태이면, 제제를 용해시킨 후에 용액으로서 사용할 수 있으리라 생각된다.

또한, 본 발명은 백혈구를 착색함으로써 적혈구 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서, 개구, 측벽부와 저부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 영역을 갖는 측벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 측적 용기내에서, 적혈구 제제의 용액과, 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 용해시킬 수 있는 세포융해제와, 염료를 혼합 및 교반함으로써 적혈구를 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색하는 단계와, 원심분리기상에 상기 축적 용기를 세팅하여 상기 축적 용기의 저부상에 착색된 백혈구를 축적하는 단계와, 착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법을 제공한다.

상기 적혈구 제제내에 백혈구 계수 방법에 있어서는, 상기 세포융해제가 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제로 이루어지는 그룹에서 선택된다. 상기 적혈구 제제의 용액에 첨가된 세포융해제의 양은 0.1 내지 10%(w/v)인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 개구, 저부와 측벽부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 백혈구 축적 용기를 제공한다. 또한, 본 발명은 저부가 백혈구가 통과할 수 없는 박막 필터를 갖는 그러한 백혈구 축적 용기를 제공한다.

본 발명에 따른 축적 용기 저부의 최대 직경은 0.2 내지 5 mm가 바람직하다. 예를 들면, 저부가 원형 형상을 가지면, 원형의 직경이 최대 직경이다. 저부가 사각형 형상을 가지면, 대각선의 길이가 최대 직경이다.

또한, 본 발명은 개구, 저부와 측벽부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 갖는 상기 백혈구 축적 용기의 저부의 상태를 들출시키는 렌즈부와, 상기 렌즈부를 통해 들출된 백혈구 축적 용기 저부의 이미지를 분석함으로써 백혈구 축적 용기의 저부상에 축적된 백혈구의 수를 검출하는 검출수단과, 상기 검출수단에 의해 얻어진 검출 결과를 출력하는 출력수단을 구비하며, 상기 검출수단은 상기 렌즈부를 통해 들출된 백혈구 축적 용기 저부의 이미지를 착상하는 이미지 착상면을 갖는 이미지 착상부와, 상기 이미지 착상면에 있는 백혈구 축적 용기 저부의 이미지내의 백혈구를 인식하는 이미지 분석 처리기와, 백혈구 계수용 계수기를 구비하고, 상기 백혈구 축적 용기의 저부는 전체 저부의 이미지가 하나의 이미지로서 상기 검출수단의 이미지 착상면내에 존재하는 크기를 갖는 백혈구 계수 장치를 제공한다. 이미지 착상부는 CCD 이미지 처리 수단을 구비하는 것이 바람직하다.

본 발명은 이하에서 상세히 설명될 것이다.

〈혈소판 제제내에 백혈구 계수 방법〉

본 발명의 백혈구를 계수하는 제 1 방법에 있어서, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해할 수 있는 세포융해제가 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판 제제의 용액내에 혈소판을 용해시키도록 첨가되고, 염료 등이 백혈구를 착색하도록 사용된 다음, 혈소판 제제의 용액내에 백혈구가 계수된다. 세포융해제를 첨가한 후에, 세포융해제가 용액내에 충분하게 확산되도록 혈소판 제제의 용액을 적절하게 흔드는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법에 사용된 세포융해제는 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해하는 한 특별히 제한되는 않는다. 그러나, 특히 그 예는 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 등을 포함한다.

특히, 상기 음이온성 계면활성제는 나트륨 도데실설페이트, 나트륨 티우로데옥시콜레이트, 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 테트라데실설페이트, 나트륨 도데실설포네이트, 나트륨 테트라데실설포네이트, 나트륨 콜레이트, 나트륨 타우로콜레이트 등을 포함한다. 특히, 상기 양이온성 계면활성제는 세틸트리메틸암모늄 브로마이드, 테트라데실트리메틸암모늄 클로라이드, 도데실피리디늄 브로마이드, 세틸피리미디늄 클로라이드 등을 포함한다. 특히, 상기 양쪽성 계면활성제는 CHAPS(3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-프로판설포네이트), CHAPSO(3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-2-하이드록시-1-프로판설포네이트), 팔미토일 리솔레시틴, 도데실-N-베타인 등을 포함한다.

특히, 상기 비이온성 계면활성제는 트리تون X-100(상표명), 노니엣 P-40(상표명), 이게팔 CA-630(상표명), 옥틸글루코사이드, 트윈 20(상표명), 트윈 80(상표명), 트리تون X-405(상표명), 도데실글루코사이드, 스테록스 67-K(상표명), 트리تون X-102(상표명), 헬틸티오글루코사이드, 데실글루코사이드, 노닐티오글루코사이드, 옥틸말토사이드, 도데실말토사이드, 데카노닐-N-메틸글루카미드, 폴리옥시에틸렌 도데실 에테르(예를 들면, Brij 시리즈, 륨보를 W와 AL 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것), 폴리옥시에틸렌 헵타메틸헥실 에테르(예를 들면, 니콜 BTD 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것), 폴리옥시에틸렌 이소옥틸 페닐 에테르(예를 들면, 트리تون X 시리즈, 니콜 OP 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것), 폴리옥시에틸렌 노닐 페닐 에테르(예를 들면, 트리تون N 시리즈, 니콜 NP 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것), 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르(예를 들면, 스팬 시리즈, 스테록스 CO 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것), 슈크로즈 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르(예를 들면, 트윈 시리즈, 에마졸 시리즈 등의 상표명으로 상업상 입수할 수 있는 것) 등을 포함한다.

이들 계면활성제중에서, 나트륨 도데실설페이트, 나트륨 타우로데옥시콜레이트, 트리تون X-100, 노니엣 P-40, 이게팔 CA-630, 옥틸글루코사이드, 트윈 20 등이 계면활성제로서 본 발명에 사용되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 트리تون X-100, 노니엣 P-40, 이게팔 CA 630 등이 사용된다. 트리تون X-100 등이 특히 바람직하다.

본 발명에서는 하나이상의 계면활성제가 사용되어도 좋다.

혈소판 제제의 용액에 첨가되는 세포융해제의 바람직한 양(혈소판 제제의 용액내에 세포융해제의 농도)은 예비 실험을 수행함으로써 결정될 수 있다. 혈소판 제제와 적혈구 제제의 탑입, 원심분리기 조건 등에 달려있지만, 혈소판 제제의 용액내에 세포융해제의 농도는 0.2 내지 5%(w/v)가 바람직하고, 0.5 내지 4%(w/v)가 보다 바람직하며, 0.8 내지 2%(w/v)가 특히 바람직하다. 이러한 범위내의 농도에서, 거의 모든 혈소판이 용해되며 첨가된 세포융해제가 좀처럼 침전되지 않는다. 따라서, 혈소판 제제의 용액은 우수한 광투과도를 보인다. 더욱이, 이러한 범위는 백혈구의 핵이 충분한 착색과 정확한 백혈구 계수가 가능한 크기로 노출될 수 있는 범위내에 있게 된다.

본 발명의 방법에 따르면, 백혈구가 혈소판으로 덮이지 않도록 혈소판이 용해되기 때문에 소량의 백혈구를 함유하는 샘플의 경우일지라도 정확한 백혈구 수가 용이하게 얻어질 수 있다.

본 발명에 사용된 세포융해제가 혈소판을 용해시키기에 적절한 상기 범위내의 농도로 사용될 때, 백혈구의 핵도 노출시킬 수 있다. 즉, 세포융해제는 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판 제제의 용액에 혈소판을 용해시키는데 사용될 수 있다.

세포융해제를 첨가한 후에, 혈소판 제제의 용액을 흔들어서 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시키는 것이 바람직하다. 일반적으로 측정 기구에 사용되는 교반기를 사용하여 5초 내지 2분 동안, 특히 바람직하게는 10초 내지 1분 동안 상기 용액을 흔드는 것이 바람직하다. 이러한 범위내에서 교반이 오랜 동안 행해지면, 백혈구의 핵이 착색을 위해 노출되며 노출된 핵은 거의 파괴되지 않는다.

본 발명의 방법에 있어서, 백혈구는 통상적인 방법에 의해 착색될 수 있다. 예를 들면, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 세포융해제는 혈소판 제제의 용액에 첨가되며; 혼합물을 백혈구의 핵을 노출시키도록 교반기를 사용하여 교반된다; 염료가 거기에 첨가되어 백혈구의 노출된 핵을 착색한다. 이와 달리, 세포융해제와 염료가 용액이 교반되기 전에 첨가될 수 있으며, 이것은 본 발명의 방법에 포함된다. 세포융해제와 염료가 동시에 첨가된다면, 그들은 혈소판 제제의 용액에 개별적으로 첨가되어도 좋다. 그러나, 수술 가능성 측면에서 미리 두 개의 작용제를 혼합하여 얻은 혼합물을 혈소판 제제의 용액에 첨가하는 것이 바람직하다.

백혈구의 노출된 핵을 착색하는데 바람직한 염료는 시아닌, 페난티리딘/아크리딘 및 인돌/이미다졸 염료를 포함한다. 특히, 페난티리딘/아크리딘 염료중에서는 프로피듐 요오드화물, 에티듐 브로마이드 및 에티듐 호모다이머가 바람직하다. 인돌/이미다졸 염료중에서는 훠히스트 33258, 훠히스트 33342, DAPI(4',6-다아미디노-2-페닐인돌), DIPI(4',6-(디이미다졸린-2-일)-2-페닐인돌) 등이 바람직하다.

또한, 본 발명의 “착색”에 의한 백혈구의 검출은 면역분석적 방법에 널리 사용되는 “발광”, “형광” 등을 사용하여 백혈구를 검출하는 것을 포함한다. 예를들면, 상이한 항원 결정소를 갖는 상이한 두개의 타입의 백혈구를 검출하기 위해서는, 제 1 형광색소를 한 타입의 백혈구에 특유한 항원 결정소에 대응하는 항체와 결합하여 제 1 항체-형광색소 공역을 제제하고 제 2 형광색소를 다른 타입의 백혈구에 특유한 항원 결정소에 대응하는 항체와 결합하여 제 2 항체-형광색소 공역을 제제하며, 상기 공역은 다수의 타입의 백혈구를 함유하는 샘플에 모두 첨가된다. 상기 제 1 항체-형광색소 공역과 제 2 항체-형광색소 공역은 각 항체에 대응하는 백혈구에 개별적으로 결합한다. 각각의 두 개의 상이한 항원 결정소를 갖는 백혈구는 예를들면 제 1 형광색소와 제 2 형광색소 각각을 상이하게 검출할 수 있는 형광 필터를 사용하여 개별적으로 계수될 수 있다. 측정 샘플내에 전체 백혈구 수가 측정될 때, 제 1 항체-형광색소 공역 또는 제 2 항체-형광색소 공역에도 결합되지 않는 백혈구의 수가 또한 측정될 수 있다.

백혈구를 계수하는 상기 제 1 방법을 사용함으로써, 혈소판 제제의 용액내 백혈구는 백혈구의 착색을 통해 간단한 방법으로 계수될 수 있다. 즉, 본 발명의 제 2 백혈구 계수 방법은 개구, 측벽부와 저부, 저부에서 개구를 향한 방향으로 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역의 일부 또는 전부를 구비하는 축적 용기를 사용하여 상기 제 1 방법에 따라 백혈구를 계수하는 방법이다.

특히, 제 2 백혈구 계수 방법에 있어서, 혈소판 제제 용액, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 세포용해제와 염료는, 개구, 측벽부와 저부, 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 축적 용기내에서 혼합된다; 그 다음 최종 용액은 혈소판을 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색시키도록 교반된다; 축적 용기는 축적 용기의 저부에서 착색된 백혈구 핵을 축적하도록 원심분리기상에 세팅된다; 그리고 백혈구 핵이 계수된다. 축적 용기가 여기에 사용될 때, 이하에 설명된 백혈구 축적 용기가 사용되는 것이 바람직하다. 백혈구는 백혈구의 핵이 상술된 것처럼 노출될 때와 동시에 착색되거나, 노출된 핵이 얻어진 후에 별개 공정에서 착색된다.

제 3 백혈구 계수 방법은 백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내에 백혈구를 계수하는 방법이며, 여기에서 혈소판은 개구, 측벽부와 백혈구가 통과할 수 없는 박막 필터를 갖는 저부, 및 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 축적 용기를 사용하는 여과법에 의해 기초 공정으로서 혈소판의 용해화가 필요없이 제거된다.

즉, 제 3 백혈구 계수 방법은 저부가 전술된 박막 필터를 갖는 전술된 축적 용기내에 혈소판 제제의 용액을 배치하는 단계와, 백혈구가 저부상에 축적되도록 혈소판 제제의 용액을 함유하는 축적 용기의 저부에서 박막 필터를 통해 혈소판 제제의 용액을 여과하는 단계와, 백혈구의 핵을 노출시켜 착색하도록 저부에 축적된 백혈구에 계면활성제와 염료를 첨가하는 단계를 구비하는 것을 특징으로 한다. 축적 용기로서는 이하에 설명된 본 발명의 백혈구 축적 용기가 사용되는 것이 바람직하다. 혈소판 제제가 샘플로서 사용되면, 혈소판은 통과 가능하고 백혈구는 통과 불가능한 소정의 박막 필터가 축적 용기의 저부에 사용될 수 있다. 바람직하게는 구멍 크기는 약 3 내지 7 μm , 특히 바람직하게는 약 4 내지 6 μm 이다.

제 3 백혈구 계수 방법에 있어서, 백혈구의 핵은 계면활성제와 염료로 노출 및 착색되기에 충분하며, 이것은 통상적인 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를들어, 계면활성제로서는 스판, 아라셀, 트원, 트리톤 시리즈 등의 계면활성제가 백혈구의 핵을 노출시키기 위해 통상의 농도로 사용될 수 있다. 제 3 백혈구 계수 방법에 있어서, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 전술된 세포용해제가 상기 계면활성제 대신에 사용될 수 있다. 또한, 그러한 실시예에는 본 발명의 제 3 백혈구 계수 방법에 포함된다는 것을 이해해야 한다.

혈소판을 용해시키거나 여과법에 의해 분리 및 제거하지 않고 백혈구가 상기 축적 용기의 저부상에 축적되면, 백혈구가 혈소판 제제의 용액내에 존재하는 많은 혈소판에 파묻혀서 백혈구를 검출하기가 어렵게 된다. 그러나, 혈소판은 제 1 백혈구 계수 방법을 사용하여 용해되거나, 혈소판이 여과법에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 작은 영역의 저부를 갖는 백혈구 축적 용기가 용기의 저부에 백혈구를 축적하는데 사용되면, 백혈구는 혈소판에 파묻히지 않게 된다. 따라서, 백혈구를 작은 영역에서 검출할 수 있으므로 검출하는데 노력이 감소될 것이다.

저부상에 축적되어 착색되는 백혈구의 검출은 예를들어 현미경을 사용하는 관찰자에 의한 시각 측정 등의 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러나, 상기 방법을 실행하는데 적절한 백혈구 계수 장치 및 상기 백혈구 축적 용기는 이하에서 상세히 설명될 것이다.

〈적혈구 제제내에 백혈구 계수 방법〉

상술된 혈소판 제제의 경우와 유사한 방법 및 장치를 사용하여 적혈구 제제내에 존재하는 백혈구는 적혈구를 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 착색함으로써 계수될 수 있다. 적혈구 제제내에 백혈구 수가 측정될 때, 적혈구 제제의 용액에 첨가될 세포융해제는 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 용해시킬 수 있는 것이다. 그 특정에 및 바람직한 예는 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 상기 세포융해제의 경우에 설명된 것과 유사한 것이다. 적혈구 제제내에 백혈구가 계수되는 경우에, 적혈구 제제의 용액에 첨가되는 세포융해제의 바람직한 농도는 다음과 같다.

적혈구 제제의 용액에 첨가되는 세포융해제의 바람직한 양(적혈구 제제내에 세포융해제의 농도)은 또한 예비 실험을 수행함으로써 결정될 수 있다. 적혈구 제제 및 세포융해제의 유형, 원심분리기 상태 등에 달려있지만, 적혈구 제제의 용액내 세포융해제의 농도는 0.1 내지 10%(w/v)가 바람직하고, 0.2 내지 5%(w/v)가 보다 바람직하며, 0.5 내지 3%(w/v)가 특히 바람직하다. 이러한 범위내의 농도에서, 거의 모든 적혈구가 용해되고 첨가된 세포융해제가 거의 침전되지 않는다. 그러므로, 적혈구 제제의 용액은 광투과도가 우수하게 된다. 더욱이, 이러한 범위내에서는, 백혈구의 핵이 충분한 착색과 정확한 백혈구 수 측정이 달성되는 정도로 충분히 노출된다.

〈본 발명의 백혈구 축적 용기 및 백혈구 계수 장치〉

본 발명의 백혈구 계수 장치(이후에 "본 발명의 측정 장치"로서도 참조됨)는, (1) 개구, 저부와 측벽부, 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 백혈구 축적 용기와, (2) 렌즈부에 의해 확대도가 변화될 수 있는 이미지로서 백혈구 축적 용기의 저부의 상태를 돌출시키는 렌즈부와, (3) 상기 렌즈부를 통해 돌출된 백혈구 축적 용기의 저부의 이미지를 분석함으로써 백혈구 축적 용기의 저부에 축적된 백혈구의 수를 검출하는 검출 수단과, (4) 상기 검출 수단에 의해 얻어진 검출 결과를 출력하는 출력 수단을 구비하며, 상기 검출 수단은, (5) 렌즈부를 통해 돌출된 백혈구 축적 용기 저부의 이미지를 착상하는 이미지 착상면을 갖는 이미지 착상부와, (6) 이미지 착상면상의 백혈구 축적 용기 저부의 이미지로부터 백혈구를 인식하는 이미지 분석 처리기와, (7) 백혈구 계수용 계수기와, (8) 전체 하부의 이미지가 하나의 이미지로서 검출 수단의 이미지 착상면에 존재하는 크기를 갖는 백혈구 축적 용기의 저부를 구비한다.

상기 백혈구 계수 장치는 개구, 저부와 측벽부, 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 본 발명의 백혈구 축적 용기(이하에서, 본 발명의 백혈구 축적 용기는 "본 발명의 용기"로서 참조될 수 있음)를 사용한다. 이러한 본 발명의 백혈구 축적 용기는 도 4 내지 12를 참조하여 먼저 설명될 것이다.

〈1〉 본 발명의 백혈구 축적 용기

본 발명의 용기는 원심분리기 등에 의해 그 저부에 백혈구를 축적하도록 사용되며 저부, 측벽부 및 개구를 구비한다. 저부의 형상은 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 원형, 사각형 등이 될 수도 있다. 그러나, 용기가 본 발명의 백혈구 계수 장치에 부착되면, 저부의 형상은 백혈구 계수 장치에 구비된 이미지 착상면과 유사한 것이 바람직하다. 저부의 최대 직경은 이하에 설명되는 바와 같이 이미지 착상면의 크기에 달려있지만, 0.2 내지 5 mm가 바람직하며, 1 내지 3 mm가 특히 바람직하다. 저부의 최대 직경은 형상에 상관없이 저부의 가장 긴 직경을 의미한다. 예를 들어, 도 4 내지 6에 도시된 백혈구 축적 용기(1)와 같이 원형 형상을 갖는다면, 그 원의 직경이 최대 직경이다. 저부가 이하의 도 7 내지 9에 도시된 백혈구 축적 용기(1A)에서 개별 샘플 저장소와 같이 사각형 형상을 갖는다면, 대각선의 길이가 최대 직경이 된다.

저부는 백혈구가 여과법에 의해 저부에 축적될 수 있도록 백혈구가 통과하지 못하는 박막 필터를 구비할 수 있다. 박막 필터를 사용하는 백혈구 축적 용기는 혈소판 제제내에 백혈구를 계수하는데 보다 유리하다.

개구의 형상도 특별히 제한되지는 않는다. 그 최대 직경은 2 내지 20 mm가 바람직하며, 3 내지 15 mm가 특히 바람직하다.

본 발명의 용기는 측벽부를 가지며, 그 일부 및 전부는 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역(이하에서, 이 부분은 "테이퍼부"로서 참조된다)을 갖는다. 상기 테이퍼부가 제공되므로, 측정에 충분한 양의 샘플 용액은 혈소판 제제 등의 용액과 같이 소량의 백혈구를 함유할 지라도 용기내에 배치될 수 있으며 용기의 저부는 상술된 바와 같이 바람직한 작은 직경을 갖는다. 백혈구가 원심분리기에 의해 축적되면, 백혈구는 원심분리기 상태에 달려있지만 하나의 원심분리기에 의해 저부상에 실질적으로 축적될 수 있음으로써, 측정이 용이하게 행해질 수 있다.

테이퍼부는 측벽부의 전부 또는 일부를 구성할 수도 있다. 바람직하게는, 테이퍼부는 저부에 인접한 부분으로부

터 제공되거나, 예를 들어 일정한 수평 단면 영역을 갖는 부분이 저부에 인접한 부분으로부터 제공되며 테이퍼부가 그 위에 제공된다. 특히, 도 4 내지 6에 도시된 용기와 같은 측벽부의 전부를 구성하도록 제공된 테이퍼부가 언급될 수 있으며, 일정 수평 단면 영역을 갖는 부분이 도 7 내지 9 등에 도시된 용기(샘플 용액 저장소)와 같이 제공되는 저부로부터 제공된다. 더욱이, 일정 수평 단면 영역을 갖는 부분상에 제공되고 도 10 내지 12 등에 도시된 용기에서와 같이 저부와 인접한 부분으로부터 제공된다.

본 발명의 용기를 형성하기 위해, 통상적인 재료가 사용될 수 있다. 백혈구는 아래에서 측정될 때는 투명 재료가 바람직하다. 폴리스티렌 수지, 유리와 아크릴 수지가 바람직하며, 그러한 재료로서 언급된 폴리스티렌 수지 등이 특히 바람직하다.

본 발명의 용기는 필요하면 개구상에 리드를 배치하는 접착부를 갖는 박판 등으로 개구를 커버하는 것이 사용된다.

도 4 내지 6은 본 발명의 백혈구 측적 용기의 일예(이후에 "실시예 1의 용기"로서도 참조됨)를 도시한다. 도 4는 본 발명의 백혈구 측적 용기의 전방 단면도를 도시한다. 도 5는 본 발명의 백혈구 측적 용기의 평면도를 도시한다. 도 6은 본 발명의 백혈구 측적 용기의 사시도를 도시한다.

실시예 1의 용기(1)는 원형 개구(11), 원형 저부(13)와 테이퍼부를 구성하는 측벽부(12) 전부를 갖는다. 저부는 3 mm의 직경을 가지며, 개구는 10 mm의 직경을 갖는다. 높이는 20 mm이다. 용기는 투명한 폴리스티렌 수지로 형성되므로, 측적된 백혈구를 저부를 통해 볼 수 있다.

도 7 내지 9는 본 발명의 백혈구 측적 용기의 다른 예(이후에, "실시예 1A의 용기"로서도 참조됨)를 도시한다. 도 7은 본 발명의 집합형 백혈구 측적 용기의 일예의 평면도이다. 도 8은 본 발명의 집합형 백혈구 측적 용기의 일예의 전방 단면도이다. 도 9는 본 발명의 집합형 백혈구 측적 용기의 집합형 용기의 일예의 측단면도이다.

실시예 1A의 용기(1A)는 다수의 동일한 용액 저장소(10)를 갖는 집합형 백혈구 측적 용기이다. 각 샘플 용액 저장소(10)는 각 샘플 용액을 조장하는 용기이다. 상기 샘플 용액 저장소(10)는 장방형 저부(13A)와 장방형 개구(11A)를 갖는다. 테이퍼부는 저부에 인접한 측벽부(12A)의 부분으로부터 제공된다. 더욱이, 일정 수평 단면 영역을 갖는 부분은 테이퍼부상에 제공된다.

실시예 1A의 용기는 48 mm의 길이, 88 mm의 폭 및 22mm의 높이를 갖는다. 샘플 용액 저장소의 저부의 최대 직경(장방형 저부의 대각선)은 약 2.8 mm이다. 실시예 1의 용기에 사용된 것과 동일 재료가 사용된다.

실시예 1A의 용기를 수용할 수 있는 버킷이 원심분리기상에 용기를 세팅하도록 사용될 수 있다. 버킷은 실시예 1A의 용기와 유사한 집합형 용기를 원심분리기상에 세팅하도록 일반적으로 사용되는 것일 수 있다.

도 10 내지 12는 본 발명의 백혈구 측적 용기(이후에 "실시예 1C의 용기"로서도 참조됨)의 다른 예를 도시한다. 도 10은 본 발명의 백혈구 측적 용기의 다른 예의 전방 단면도이다. 도 11은 본 발명의 백혈구 용기의 다른 예의 평면도이다. 도 12는 본 발명의 백혈구 측적 용기의 다른 예의 사시도이다.

실시예 1C의 용기(1C)는 테이퍼부(12Ba)와 원통부(12Bb)로 구성되는 측벽부를 갖는다. 실시예 1C의 원통부는 저부(13B)의 주변에 결합되며 일정 수평 단면 영역을 갖는다. 테이퍼부(12Ba)는 개구(11B)까지 원통부상에서 제공된다.

〈본 발명의 백혈구 계수 장치〉

본 발명의 백혈구 계수 장치는 본 발명의 상기 백혈구 측적 용기의 저부에 측적된 백혈구를 검출하고 백혈구를 계수하는 장치이다.

본 발명의 백혈구 계수 장치에 있어서, 백혈구 측적 용기의 저부 상태는 얻어진 이미지의 확대도가 변화될 수 있고 얻어진 이미지가 이미지 착상면을 갖는 검출 수단에 의해 착상되는 렌즈부를 통해 이미지로서 돌출된다. 즉, 사용될 수 있는 소정의 렌즈부는 백혈구 측적 용기의 저부의 상태를 이미지로서 돌출시킬 수 있고 백혈구가 검출 수단에 의해 인식되어 그 수가 계수될 수 있는 크기로 검출 수단의 이미지 착상면상에서 저부의 이미지 크기를 변화시킬 수 있는 확대도를 갖는다. 1 내지 10의 확대도가 사용되는 것이 바람직하다. 측정 기구에서 이미지의 확대도를 변화시키는데 통상 사용되는 소정의 렌즈부는 상술된 바와 같이 이미지의 확대도를 변화시킬 수 있는 한 사용될 수 있다. 도 15와 16에서 도시된 예들에서는 시스템과 측정 기구의 원리를 간단하게 나타내기 위해 단 하나

의 렌즈가 도시되었지만 다수의 렌즈가 사용될 수도 있다.

검출 수단은 이미지 착상면을 갖는 이미지 착상부와, 이미지 착상면상에서 백혈구 축적 용기 저부의 이미지에서 백혈구를 인식하는 이미지 분석 처리기와, 백혈구 계수용 계수기를 구비한다.

이미지 착상부는 저부의 이미지를 착상한다. 이미지 착상부상에 제공된 이미지 착상면은 렌즈를 통해 들출된 전체 저부의 이미지가 한 필드내에 있는 크기를 갖는다. 이러한 목적을 위해, 저부의 크기, 렌즈의 확대도 및 이미지 착상면의 크기, 또는 그 조합이 조절될 것으로 예상된다. 본 발명에 있어서, 이미지 착상면의 크기는 본 발명의 상기 백혈구 축적 용기를 사용함으로써 측정 기구에 일반적으로 사용되는 범위내에 세팅될 수 있다.

상기 이미지 착상부는 후술되는 이미지 분석 처리기와의 관계 측면에서 CCD 이미지 처리 수단을 구비하는 것이 바람직하다.

이미지부의 이미지 착상면상에 들출된 백혈구는 이미지 분석 처리기에 의해 인식된다. 소정의 이미지 분석 처리기는 착색된 백혈구를 인식할 수 있는 한 사용될 수 있다, 즉 백혈구를 착색하는데 사용되는 형광색소, 형광 물질, 발광 물질 등을 인식할 수 있는 이미지 분석 처리기가 사용될 수 있다. 이미지 분석 처리기에 의해 인식된 백혈구는 백혈구 계수기에 의해 계수된다.

측정된 백혈구 수는 출력 수단으로부터 출력된다. 소정의 출력 수단은 측정자가 백혈구 수를 인지하도록 하는데 사용될 수 있다. 프린터 또는 모니터에 의한 이미지 디스플레이와 같은 통상적인 수단이 사용될 수 있다.

광학 측정 기구로서 일반적으로 사용되는 기구 또는 장치가 본 발명의 측정 장치에 연결될 수도 있다. 예를 들면, 크세논 램프, YAG 레이저(532 nm), 할로겐 램프, 금속 할라이드 램프 또는 초고압 수은 램프와 같이 이미지 착상면상에 이미지를 들출시키도록 관측면을 조명하는 광원과, 여기광 필터와 형광 필터와 같이 트정 파장만을 투과시키는 필터와, 2 색성 거울 등을 구비할 수 있다.

본 발명의 백혈구 계수 장치에 있어서, 백혈구는 백혈구 축적 용기의 저부상에 축적되어 작은 영역내에서 검출될 수 있다. 관측될 용기의 저부가 하나의 이미지로서 이미지 착상면에 존재하지 않으면, 전체 저부는 렌즈부 등을 이동시킴으로써 스캔되어야 한다. 그러나, 이러한 동작은 본 발명의 측정 장치의 경우에 필요하지 않다. 그러므로, 렌즈 등에 의해 스캔된 다수의 이미지를 통합하는 시스템 또는 프로그램을 필요로 하지 않는 간단한 측정 장치가 제공될 수 있다.

본 발명의 백혈구 계수 장치는 본 발명의 상기 백혈구 계수 방법을 실행하는데 적절하며, 혈소판 제제 용액 또는 적혈구 제제 용액내에 백혈구 계수의 기계화를 가능하게 한다. 따라서, 간단한 방법으로 측정을 수행할 수 있다. 또한, 백혈구 계수는 기계화된 측정 장치를 사용하여 자동화될 수 있다. 본 발명의 백혈구 계수 장치를 사용하여 측정될 수 있는 샘플은 혈소판 제제 및 적혈구 제제에 제한되지는 않지만, 다른 혈액 제제내에 백혈구 계수도 그 것을 사용하여 측정될 수 있다.

본 발명의 백혈구 계수 장치는 도 15 내지 17을 참조하여 이하에서 설명될 것이다. 도 15는 본 발명의 백혈구 계수 장치의 일예의 원리를 도시한다. 도 15(i)는 전체 측정 장치(5)를 도시하고 (ii)는 이미지 착상면상의 이미지를 도시한다. 축적된 백혈구(3)는 백혈구 축적 용기(1)의 저부(13)에 존재한다. 전체 저부는 렌즈부(51)를 통해 확대되어 하나의 이미지로서 이미지 착상면(521a)상에서 들출된다. 이미지 착상면상에, 관측될 필드(521c)인 백혈구 축적 용기(1)의 전체 저부가 하나의 이미지(521b)로서 착상된다. CCD 이미지 처리기(521)는 이미지 착상면(521a)상에 착상된 이미지(521b)를 전기 신호로 변환하여 이미지 분석 처리기(522A)로 전송한다. 이미지 분석 처리기(522A)에서, 전송된 이미지의 축적된 백혈구(3)가 인식된다. 인식된 백혈구의 수는 백혈구 계수기(523)에 의해 계수되어 전체 수가 얻어진다. 이미지상의 백혈구(3)의 전체 수는 출력 프린터(53)에 의해 출력된다.

도 16(i)는 백혈구 계수 장치의 비교예의 원리를 도시한다. 도 16(ii)는 이미지 착상면상에서 들출될 수 있는 백혈구 축적 용기의 저부의 이미지 영역을 도시한다. 도 15에 도시된 백혈구 계수 장치와 비교한 차이점을 주로 이하에서 설명될 것이다. 도 16에 도시된 백혈구 계수 장치에 있어서, 저부의 전체 이미지는 렌즈부(51)에 의해 착상될 수 없다. (ii)에서 빛금 부분(521d)만이 하나의 이미지로서 착상될 수 있다. 따라서, 관측될 필드(521e)인 백혈구 축적 용기(1B)의 전체 저부로부터 백혈구를 검출하기 위해서는, 다수의 이미지를 얻고 그들을 통합하여 백혈구의 전체 수를 측정하도록 저부가 렌즈부에 의해 스캔되어야만 한다. 그러므로, 비교예의 백혈구 계수 장치는 이미지 분석 처리기(522B)에 생성 이미지 통합 프로그램을 구비한다. 그러한 프로그램은 본 발명의 백혈구 계수 장치에 기본적인 것은 아니다.

도 17은 본 발명의 백혈구 계수 장치의 다른 실시예의 원리를 도시한다. 도 17에 도시된 백혈구 계수 장치의 경우에, 도 15에 도시된 본 발명의 백혈구 계수 장치의 동일 항목에는 동일 번호가 부여되며, 단지 차이점만이 설명될 것이다.

도 17에 도시된 백혈구 계수 장치(5)에서는 광원(54)이 백혈구 축적 용기(5) 하부에 설치된다. 세종류의 여기광 필터(55a, 55b 및 55c)를 갖는 여기광 필터 슬라이더(55)는 광원(54)과 백혈구 축적 용기(5)의 하부 사이에 제공된다. 여기광 필터 슬라이더(55)가 광원(54)과 저부 사이에 배치되므로, 여기광 필터중 어떤 하나가 여기광 필터 슬라이더를 슬라이딩시킴으로써 선택될 수 있다.

2색성 거울(57)이 상기 여기광 필터 슬라이더(55) 상부에 설치된다. 여기광 필터에 의해 선택된 광은 2색성 거울(57)을 통해 투과되어 관측면상에 조사된다. 2색성 거울(57)에 의해 반사된 발생 형광은 형광 필터(56a, 56b 및 56c)를 통해 투과되어 렌즈부(51)를 통해 CCD 이미지 처리 수단(521)의 이미지부상에 돌출된다. 세종류의 형광 필터중에 어떤 하나가 형광 필터 슬라이더(56)를 슬라이딩시킴으로써 선택될 수 있다.

도 17에 도시된 백혈구 계수 장치는 각각의 여기광 필터(55a, 55b 및 55c)와 형광 필터(56a, 56b 및 56c)의 세 종류중에서 적절한 것을 선택함으로써 상이한 형광색소로 착색된 백혈구의 수를 용이하게 측정할 수 있다.

실시예

〈본 발명을 실행하는 최상의 형태〉 본 발명의 예는 이하에서 설명된다.

예 1 : 혈소판 제제의 백혈구 수 <1> 혈소판 제제 용액내에 혈소판의 용해도 15 μl 의 트리톤 X-100 계면 활성제는 최종 농도가 0.01 내지 10%가 되도록 다양한 농도로 혈소판 제제의 용액에 첨가된다. 트리톤 X-100이 첨가된 혈소판 제제의 각 용액은 백혈구의 핵의 노출을 가속하기 위해 20초 동안 블텍스 믹서(과학 산업)에 의해 교반되며, 혈소판 제제의 용액내에 혈소판 수는 트리톤 X-100에 의한 혈소판의 용해도의 값을 구하기 위해서 혈구계[시스템스(상표명), 토아 메디컬 일렉트로닉스 컴파니, 리미티드]에 의해 측정된다. 동시에, 혈소판 제제의 용액의 광투과도가 분광계(벡맨)에 의해 측정된다.

혈소판 제제 용액내에 혈소판 수와 광투과도에 대한 측정 결과는 도 1 및 2에 도시되어 있다. 도 1 및 2에 있어서, PRP 및 PPP는 혈소판 희박 플라스마(platelet rich plasma)와 혈소판 농후 플라스마(platelet poor plasma)를 각각 나타낸다.

도 1에 도시된 바와 같이, 혈소판 제제 용액내 혈소판 수는 트리톤 X-100의 농도에 따라 감소되고 혈소판은 트리톤 X-100의 농도에 따라 용해되는 것으로 보인다. 특히 혈소판의 대부분은 트리톤 X-100의 농도가 0.2%보다 높을 때 용해되는 것으로 보인다.

도 2에 도시된 바와 같이, 샘플의 광투과도는 1%의 트리톤 X-100의 농도까지 트리톤 X-100 농도의 증가로 증가되지만, 혈소판 제제의 용액은 트리톤 X-100의 침적으로 인해 혼탁을 보이기 시작하며, 광투과도는 농도가 1%를 초과할 때 저하된다.

<2> 혈소판 제제 용액내에 혈소판 수(1)원심분리기에 의한 착색된 백혈구 축적 방법도 13에 도시된 바와 같이, 0.45 ml의 혈소판 제제(2), 10% 농도인 0.05 ml의 트리톤 X-100, 및 1 mM의 농도인 0.015 ml의 프로피듬 요오드화물이 상기 실시예 1(도 4 내지 6)에 첨가되어 20 초동안 블텍스 믹서에 의해 교반되므로 혈소판이 용해되고 백혈구의 핵이 노출되어 착색된다. 도 13에 있어서, 3a와 3b는 핵이 노출되어 착색되기 전의 백혈구와 핵이 노출되어 착색된 후의 백혈구를 각각 나타낸다. 축적 용기는 착색된 백혈구를 축적하도록 5분 동안 원심분리기(토미 세이코 컴파니, 리미티드, 모델 LC06-SP)위에 세팅된다.

백혈구가 저부상에 축적된 용기를 CCD 이미지 처리기가 설치된 백혈구 계수 장치위에 세팅하여 저부상에 축적된 백혈구를 검출하고 백혈구 수를 측정한다. 실시예 1의 용기 저부의 이미지는 하나의 이미지로서 CCD 이미지 처리기의 이미지 착상면내에 있게 된다. 그러므로, 이미지 착상면 등은 스캔될 필요가 없다.

(2)여과법에 의해 백혈구를 축적하고 핵을 노출시켜 착색하는 방법도 14에 도시된 바와 같이, 0.5 ml의 혈소판 제제(2)는 저부가 박막 필터(131)로 이루어지고 백혈구가 흡입 여과법에 의해 저부상에 축적되는 것을 제외하고 실시예 1과 유사한 용기내에 배치된다. 1.0% 농도인 0.1 ml 트리톤 X-100과 1 mM 농도인 0.003 ml 프로피듬 요오드화물이 첨가되므로 백혈구의 핵이 노출되고 착색된다. 도면번호 3a와 3b는 전술된 도 13에서와 동일 항목을 나타낸다.

백혈구가 필터상에 축적되는 용기는 CCD 이미지 처리기에 의해 저부상에 축적된 백혈구를 검출하여 백혈구 수를 측정하도록 CCD 이미지 처리기가 설치된 백혈구 계수 장치상에 세팅된다. 실시예 1의 용기 저부의 이미지는 하나의 이미지로서 CCD 이미지 처리기의 이미지 착상면내에 있게 된다. 그러므로, 이미지 착상면 등은 스캔되는 것이 필요없어진다.

예 2 : 적혈구 제제내에 백혈구 수 <적혈구 제제내에 적혈구의 용해도> $15 \mu\text{l}$ 의 계면활성제, 트리톤 X-100이 최종 농도가 0.01 내지 10%가 되도록 다양한 농도로 적혈구 제제의 용액에 첨가된다. 트리톤 X-100이 첨가되는 각 적혈구 제제의 용액은 백혈구 핵을 노출시키는 것을 가속하기 위해 볼텍스 믹서(과학 산업)에 의해 20 초동안 교반되고, 적혈구 제제의 용액내에 적혈구 수가 자동 혈구계[시스멕스(상표명), 토아 메디컬 일렉트로닉스 컴파니, 리미티드]에 의해 측정되어 트리톤 X-100에 의한 적혈구의 용해도의 값을 구한다. 동시에, 백혈구(백혈구 핵)의 노출된 핵이 플로우 세포계산기(쿠ول터, 모델 EICS XL)에 의해 계수된다.

적혈구 제제의 용액내에 있는 적혈구 수와 노출된 백혈구 핵의 수에 대한 결과는 도 3에 도시되어 있다.

<적혈구 제제의 용액내에 백혈구 수> $87 \mu\text{l}$ 의 적혈구 제제, 10 % 농도인 $10 \mu\text{l}$ 의 트리톤 X-100 및 1 mM 농도인 $3 \mu\text{l}$ 의 프로파蠢 요오드화물이 상기 실시예 1(도 4 내지 6)의 용기에 첨가되고 적혈구가 용해되고 백혈구의 핵이 노출되어 착색되도록 볼텍스 믹서에 의해 20 초 동안 교반된다. 축적 용기는 착색된 백혈구(도 13의 도면부호 2가 적혈구 제제를 지시하는 경우와 대응함)를 축적하기 위해 5분 동안 원심분리기(토미 세이코 컴파니, 리미티드, 모델 LC06-SP)상에 세팅된다.

백혈구가 저부상에 축적되는 용기는 CCD 이미지 처리기가 설치된 백혈구 계수 장치상에 세팅되어 상기 CCD 이미지 처리기에 의해 저부상에 축적된 백혈구를 검출하고 백혈구 수를 측정한다. 실시예 1의 용기 저부의 이미지는 하나의 이미지로서 CCD 이미지 처리기의 이미지 착상면내에 있게 된다. 그러므로, 이미지 착상면 등은 스캔될 필요가 없게 된다.

측정 결과는 샘플로서 사용된 적혈구 제제(200 ml)의 백내에 있는 백혈구 수가 2×10^7 인 것을 알았다.

산업상이용가능성

본 발명의 백혈구 계수 방법에 따르면, 샘플이 소량의 백혈구를 함유하고 있을 지라도 혈소판 또는 적혈구가 용해되어 있기 때문에 백혈구가 혈소판 또는 적혈구로 덮이지 않게 되므로, 백혈구 수의 정확하고 용이한 측정이 가능해진다. 특히, 본 발명의 백혈구 축적 용기를 사용하여 소영역내에서 백혈구가 검출될 수 있으므로, 측정에 필요한 수고가 감소될 수 있다. 또한, 본 발명의 백혈구 계수 장치는 간단한 시스템에 의해 구성될 수 있다. 본 발명의 백혈구 계수 장치는 백혈구 수의 기계화된 측정과 자동 측정을 가능하게 한다.

(57) 청구의 범위

청구항1

백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서,
백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 혈소판 제제의 용액에 용해시킬 수 있는 세포융해제를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 혈소판 제제의 용액에 용해시키는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법.

청구항2

백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서,
개구, 측벽부와 저부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 영역을 갖는 측벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 축적 용기내에서, 혈소판 제제의 용액과, 백혈구의 핵을 노출시키고 혈소판을 용해시킬 수 있는 세포융해제와, 염료를 혼합 및 교반함으로써 혈소판을 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색하는 단계와;

원심분리기상에 상기 축적 용기를 세팅하여 상기 축적 용기의 저부상에 착색된 백혈구를 축적하는 단계와,
착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법.

청구항3

제 1 항 또는 2 항에 있어서, 상기 세포융해제는 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 백혈구 계수 방법.

청구항4

제 1 항, 2 항 또는 3 항에 있어서, 상기 혈소판 제제의 용액에 첨가된 세포융해제의 양은 0.2 내지 5%(w/v)인 백혈구 계수 방법.

청구항5

백혈구를 착색함으로써 혈소판 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서,

개구와, 측벽부와, 백혈구가 통과할 수 없는 박막 필터를 갖는 저부와, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 축적 용기내에 혈소판 제제의 용액을 배치하는 단계와,

혈소판 제제의 용액을 수용하는 축적 용기의 저부에 설치된 박막 필터를 통해 혈소판 제제의 용액을 여과하여 저부상에 백혈구를 축적하는 단계와,

상기 저부상에 축적된 백혈구에 계면활성제와 염료를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 백혈구를 착색하는 단계와,

상기 착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법.

청구항6

백혈구를 착색함으로써 적혈구 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서,

백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 적혈구 제제의 용액에 용해시킬 수 있는 세포융해제를 첨가하여 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 적혈구 제제의 용액에 용해시키는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법.

청구항7

백혈구를 착색함으로써 적혈구 제제내의 백혈구를 계수하는 백혈구 계수 방법에 있어서,

개구, 측벽부와 저부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 영역을 갖는 측벽부의 일부 또는 전부를 구비하는 축적 용기내에서, 적혈구 제제의 용액과, 백혈구의 핵을 노출시키고 적혈구를 용해시킬 수 있는 세포융해제와, 염료를 혼합 및 교반함으로써 적혈구를 용해시키고 백혈구의 핵을 노출시켜 백혈구를 착색하는 단계와,

원심분리기상에 상기 축적 용기를 세팅하여 상기 축적 용기의 저부상에 착색된 백혈구를 축적하는 단계와,
착색된 백혈구를 계수하는 단계를 구비하는 백혈구 계수 방법.

청구항8

제 6 항 또는 7 항에 있어서, 상기 세포융해제는 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 백혈구 계수 방법.

청구항9

제 8 항에 있어서, 상기 적혈구 제제의 용액에 첨가된 세포융해제의 양은 0.1 내지 10%(w/v)인 백혈구 계수 방법.

청구항10

개구, 저부와 측벽부, 상기 저부에서 개구를 향한 방향에서 점진적으로 증가하는 수평 단면 영역을 갖는 측벽부의 부분 또는 전부를 구비하는 백혈구 축적 용기.

청구항11

제 10 항에 있어서, 상기 저부는 백혈구가 통과할 수 없는 박막 필터를 갖는 백혈구 축적 용기.

청구항12

제 10 또는 11 항에 있어서, 상기 저부는 0.2 내지 5 mm의 최대 직경을 갖는 백혈구 축적 용기.

청구항13

제 10 항 내지 12 항중 어느 한 항에서 한정된 백혈구 축적 용기와,

확대도가 렌즈부에 의해 변화될 수 있는 이미지로서 상기 백혈구 축적 용기의 저부의 상태를 들출시키는 렌즈부와,

상기 렌즈부를 통해 돌출된 백혈구 축적 용기 저부의 이미지를 분석함으로써 백혈구 축적 용기의 저부상에 축적된 백혈구의 수를 검출하는 검출 수단과,

상기 검출 수단에 의해 얻어진 검출 결과를 출력하는 출력 수단을 구비하며,

상기 검출 수단은 상기 렌즈부를 통해 돌출된 백혈구 축적 용기 저부의 이미지를 확상하는 이미지 확상면을 갖는 이미지 확상부와, 상기 이미지 확상면상에 있는 백혈구 축적 용기 저부의 이미지내의 백혈구를 인식하는 이미지 분석 처리기와, 백혈구 계수용 계수기를 구비하고,

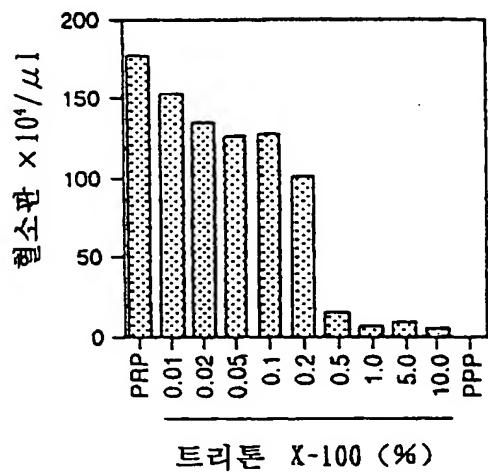
상기 백혈구 축적 용기의 저부는 전체 저부의 이미지가 하나의 이미지로서 상기 검출 수단의 이미지 확상면내에 존재하는 크기를 갖는 백혈구 계수 장치.

첨구항14

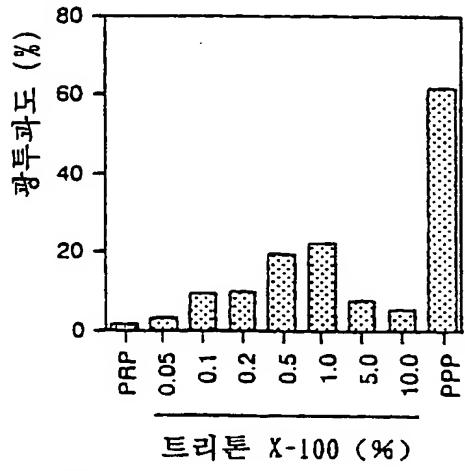
제 13 항에 있어서, 상기 이미지 확상부는 CCD 이미지 처리 수단을 구비하는 백혈구 계수 장치.

도면

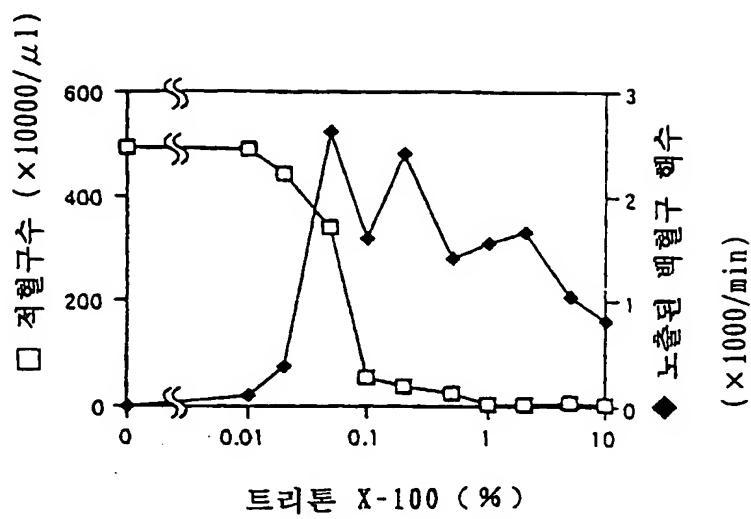
도면1



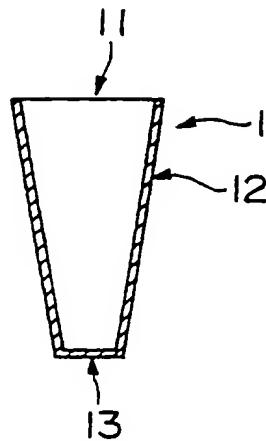
도면2



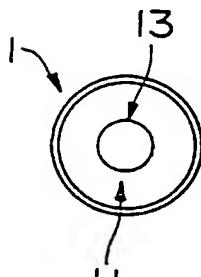
도면3



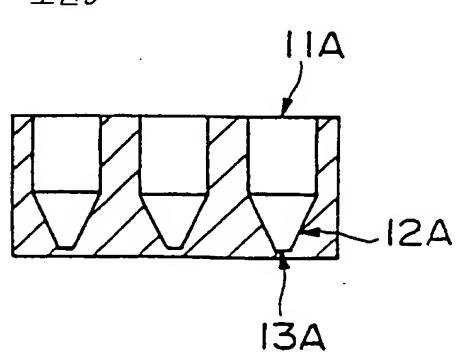
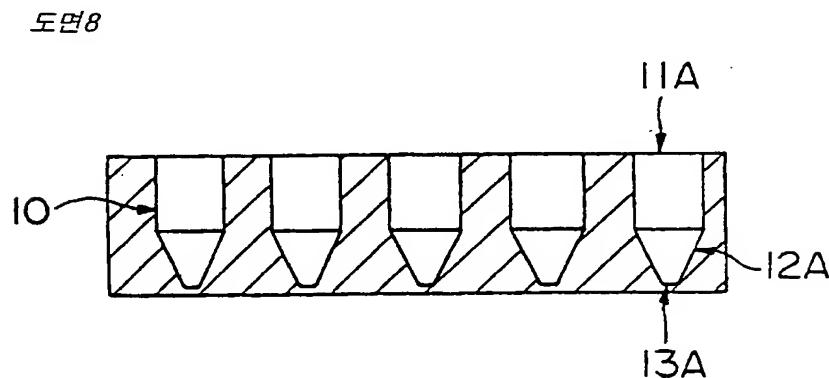
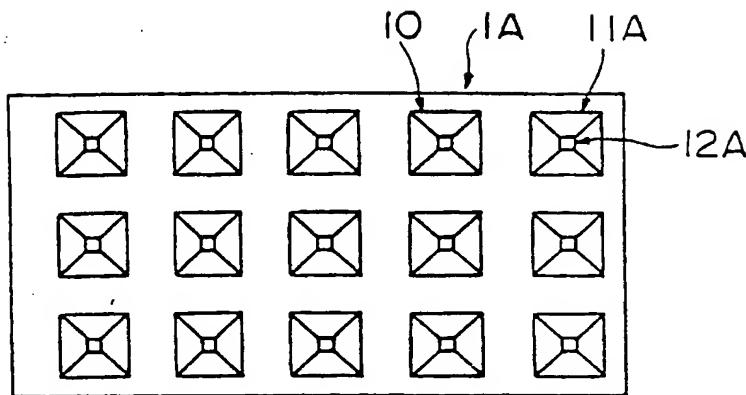
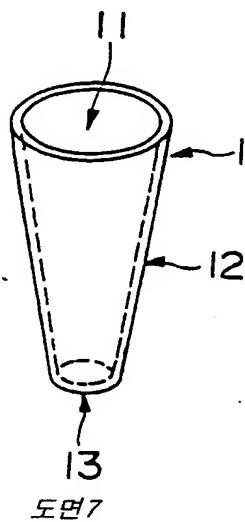
도면4

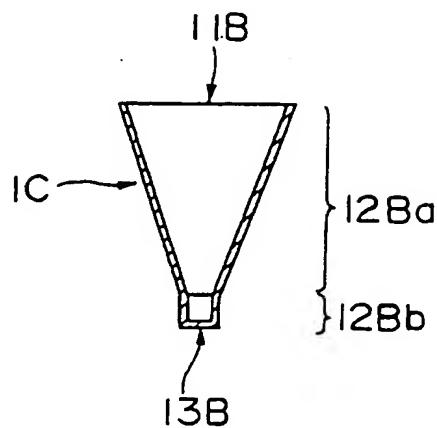


도면5

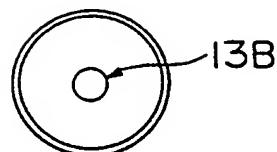


도면6

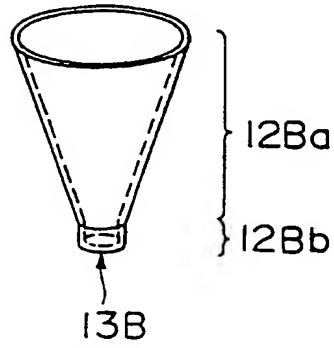




도면11



도면12

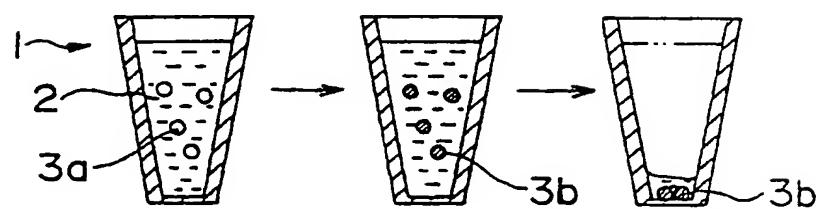


도면13

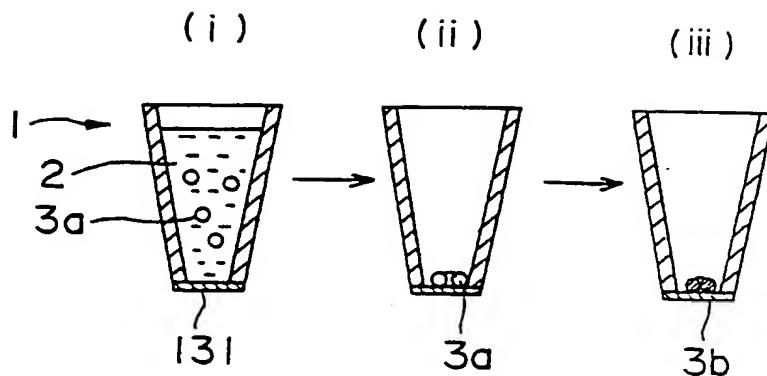
(i)

(ii)

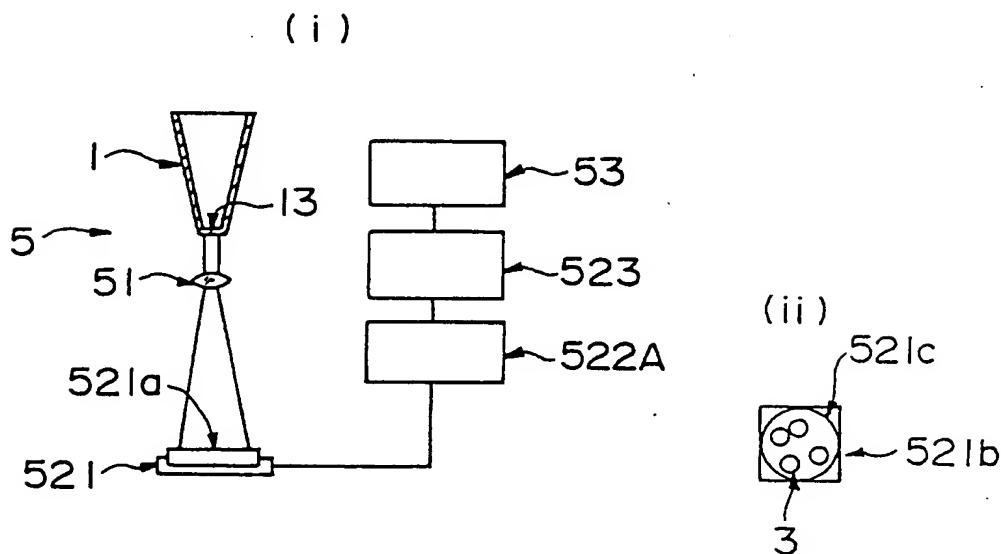
(iii)



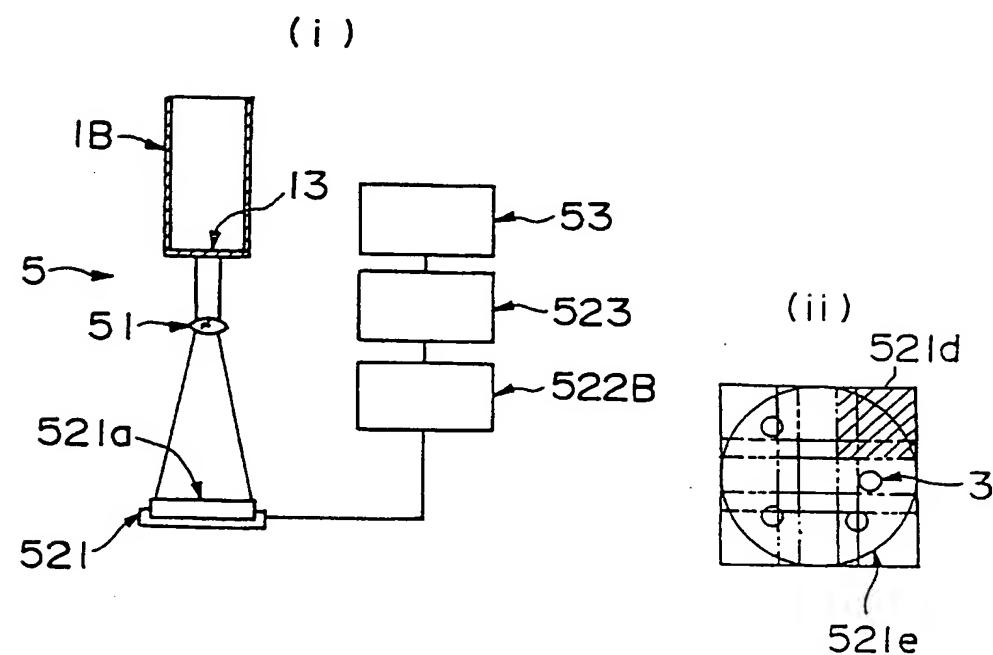
도면14



도면15



도면16



도면17

